

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI
(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

IM- *Image available*

AA- 93-312311/199340 |

XR- <XRAM> C93-138893|

XR- <XRPX> N93-240412|

TI- **Affinity sensor for concn. measurements of low molecular wt. analytes - consists of a hollow fibre or microcapsule contg. 2 macromolecular affinity ligands one of which can be displaced by the analyte|**

PA- BALLERSTAEDT R (BALL-I); EHWALD R (EHWA-I)|

AU- <INVENTORS> BALLERSTAEDT R; EHWALD R|

NC- 001|

NP- 001|

PN- DE 4203466 A1 19930805 DE 4203466 A 19920204 G01N-033/50 199340 B
|

AN- <LOCAL> DE 4203466 A 19920204|

AN- <PR> DE 4203466 A 19920204|

LA- DE 4203466(3)|

AB- <BASIC> DE 4203466 A

An affinity sensor for measuring the concn. of a low molecular analyte consists of a hollow fibre or microcapsule with an enclosed colloidal soln. of 2 macromolecular affinity ligands. The affinity ligands do not precipitate on account of an excess of one component and on account of one or both components being monovalent. One of the affinity ligands can be displaced from its compound with the other by a lower molecular analyte. The membrane of the hollow fibre or microcapsule is permeable for the analyte and impermeable for the two high molecular affinity ligands. The viscosity of the soln. within the hollow fibre can be registered with a physical measuring device.

USE/ADVANTAGE - The sensor can be used for many possible cases of affinity-bonding relationships and does not require immobilisation of an affinity ligand on a surface. The sensor can be used to measure the concn. of low molecular analytes, such as sugars.

Dwg.1/2|

DE- <TITLE TERMS> AFFINITY; SENSE; CONCENTRATE; MEASURE; LOW; MOLECULAR;
WEIGHT; ANALYTE; CONSIST; HOLLOW; FIBRE; MICROCAPSULE; CONTAIN;
MACROMOLECULAR; AFFINITY; LIGAND; ONE; CAN; DISPLACE; ANALYTE|

DC- B04; D16; J04; S03|

IC- <MAIN> G01N-033/50|

IC- <ADDITIONAL> G01N-033/53|

MC- <CPI> B04-B04A6; B04-B04C2; B04-B04C6; B07-A02; B10-A07; B11-C07A7;
B11-C08; B12-K04A; D05-H09; J04-B01|

MC- <EPI> S03-E14H4|

FS- CPI; EPI||



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 42 03 466 A 1**

51 Int. Cl.⁵:
G 01 N 33/50
G 01 N 33/53
// C07K 15/28, B01D
69/08, B01J 13/02

21 Aktenzeichen: P 42 03 466.3
22 Anmeldetag: 4. 2. 92
43 Offenlegungstag: 5. 8. 93

DE 42 03 466 A 1

71 Anmelder:

Ehwald, Rudolf, Prof.Dr., O-1040 Berlin, DE;
Ballerstädt, Ralph, O-1100 Berlin, DE

72 Erfinder:

gleich Anmelder

54 Affinitäts-Sensor

57 Die Erfindung betrifft einen Affinitäts-Sensor, der für die Messung der Konzentration eines niedermolekularen Analyten A geeignet ist. Voraussetzung für seine Anwendung ist, daß für A ein löslicher hochmolekularer Affinitätsligand L, z. B. eine Lektin oder Antikörper existiert, und daß ein weiterer hochmolekularer Stoff B existiert, der mit L eine Affinitätsbindung eingeht, aus der er durch den Analyten verdrängt werden kann. Die wirksame Komponente des Sensors ist eine Holfaser oder eine Mikrokapsel mit einer eingeschlossenen möglichst konzentrierten Lösung der beiden hochmolekularen Liganden L und B, die wegen des Überschusses eines der Liganden oder wegen der Monovalenz eines Liganden kolloiddispers bleibt. Außerdem enthält der Sensor eine Meßvorrichtung für die Viskosität der eingeschlossenen Lösung. Beim Eindringen des Analyten in den Sensor ändert sich die Dispersion und damit die Viskosität der eingeschlossenen Lösung, wobei diese Änderung um Größenordnungen über derjenigen liegt, die durch die Konzentrationsänderung des Analyten selbst bedingt ist.

DE 42 03 466 A 1

Beschreibung

Bisher entwickelte Affinitäts-Sensoren für niedermolekulare Stoffe beruhen auf der Dissoziation eines immobilisierten und eines löslichen hochmolekularen Affinitätsliganden durch die konkurrierende Bindung des Analyten an einen der Bindungspartner (z. B. Shultz, J., Mansouri, S., Goldstein, I. J., Diabetes Care 5, 95, 1982) oder auf den physikochemischen Änderungen an einer Oberfläche mit immobilisierten Affinitätsliganden durch die Affinitätsbindung des Analyten (z. B. Bush, D. L., Rechnitz, G. A., Anal. Lett. 20, 1781, 1987). Es handelt sich also bei den bisher bekannten Sensorvarianten (vergl. Stein, K. und Neumann, K. D., Biosensoren, in G. Schwedt (Herausg.) Literaturdokumentation Biosensoren, Vogel Verlag und Druck KG, Würzburg 1991) um Geräte, die eine Änderung von Affinitäts-Bindungs-gleichgewichten an der Fest-Flüssig-Grenzfläche in ein meßbares Signal umwandeln. Dies bedingt, daß die Einstellung des Gleichgewichtes verzögert, die Empfindlichkeit durch die Oberfläche begrenzt wird oder ganz besondere Auswahlkriterien für den Analyten und den Affinitäts-Bindungspartner gegeben sind und erfordert zudem die Immobilisierung eines Affinitätsliganden an einer Oberfläche.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, einen Affinitäts-Sensor bereitzustellen, der für viele mögliche Fälle von Affinitäts-Bindungsbeziehungen einsetzbar ist und nicht die Immobilisierung eines Affinitätsliganden an einer Oberfläche erfordert.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die sensorisch wirksame Komponente eine Hohlfaser oder eine Mikrokapsel mit einer eingeschlossenen kolloidalen Lösung von 2 makromolekularen Affinitätsliganden darstellt, die Affinitätsliganden wegen des Überschusses einer Komponente oder wegen der Monovalenz einer oder beider Komponenten nicht präzipitieren, einer der Affinitätsliganden aus seiner Bindung mit dem anderen durch einen niedermolekularen Analyten verdrängt werden kann, die Membran der Hohlfaser oder Mikrokapsel permeabel für den Analyten und unpermeabel für die beiden hochmolekularen Affinitätsliganden und die Viskosität der Lösung im Inneren der Hohlfaser durch eine physikalische Meßvorrichtung registrierbar ist. Die Meßanordnung ist für alle niedermolekularen Stoffe geeignet, für die polyklonale oder monoklonale Antikörper hergestellt werden können. Als zweiter hochmolekularer Bindungspartner ist generell ein Konjugat des Analyten mit einem natürlichen oder synthetischen Polymeren geeignet, außerdem kommen natürliche hochmolekulare Antigene mit einem dem Analyten strukturähnlichen Epitop in Frage. Besonders geeignet sind monoklonale Antikörper, die monovalent sind und nicht zur Präzipitation führen, weil so das hochmolekulare kolloiddisperse System im Inneren der Hohlfaser oder Kapsel in hoher Konzentration in stabiler Dispersion vorliegt. Es ist aber, wie im Beispiel dargelegt, auch möglich, eine Lösung aus polyvalenten (z. B. Concanavalin A) und bivalenten hochmolekularen Affinitätspartnern (z. B. Ficoll) im kolloidalen Zustand so einzustellen, daß die Dispersität stabil ist und selektiv von der Anwesenheit des niedermolekularen Analyten abhängt.

Ausführungsbeispiel

Eine Hohlfaser aus Celluloseacetat mit einem Innendurchmesser von 50 µm, Außendurchmesser 100 µm wird mit 2 Pipettenrohren verbunden (Abbildung, a) und

in ein Gefäß mit 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.3 eingebracht. Das System wird mit Puffer gefüllt, so daß der Meniscus in beiden Rohren auf gleicher Höhe liegt. Durch Anlegen von Unterdruck auf einer Seite des Rohres wird ein Höhenunterschied (Δh) erzeugt. Die Halbwertszeit τ_1 für den gravitationsbedingten Ausgleich des Höhenunterschiedes wird als Maß der Viskosität des Puffers gemessen. Danach wird das System mit einer Lösung aus Concanavalin A (1,7%) und Ficoll (1,7%) gefüllt und die Halbwertszeit τ_2 gemessen. Die spezifische Viskosität der Kolloide $\eta_{spz} = (\tau_2 - \tau_1)/\tau_1$ wird zunächst in Abwesenheit von Zucker im Probengefäß bestimmt, anschließend bei Anwesenheit von Glukose in unterschiedlicher Konzentration.

Die spez. Viskosität ist in starkem Maße von der Glukosekonzentration abhängig. Die Änderungen im mM-Bereich liegen um mehrere Größenordnungen über der Veränderung der spez. Viskosität durch die Erhöhung der Glukosekonzentration und besitzen das entgegengesetzte Vorzeichen (Abbildung, b). Abbildung: Schematischer Aufbau der Meßanordnung (a) und spezifische Viskosität der Innenlösung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration.

Patentansprüche

1. Affinitäts-Sensor, dadurch gekennzeichnet, daß die sensorisch wirksame Komponente eine Hohlfaser oder eine Mikrokapsel mit einer eingeschlossenen kolloidalen Lösung von 2 makromolekularen Affinitätsliganden darstellt, die Affinitätsliganden wegen des Überschusses einer Komponente oder wegen der Monovalenz einer oder beider Komponenten nicht präzipitieren, einer der Affinitätsliganden aus seiner Bindung mit dem anderen durch einen niedermolekularen Analyten verdrängt werden kann, die Membran der Hohlfaser oder Mikrokapsel permeabel für den Analyten und unpermeabel für die beiden hochmolekularen Affinitätsliganden und die Viskosität der Lösung im Inneren der Hohlfaser durch eine physikalische Meßvorrichtung registrierbar ist.
2. Affinitäts-Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer der hochmolekularen Affinitätsliganden ein Lektin, der andere ein Glykolid und der Analyt ein Zucker ist.
3. Affinitäts-Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer der hochmolekularen Affinitätsliganden einen Antikörper gegen den Analyten darstellt, der andere ein Konjugat des Analyten mit einem natürlichen oder künstlichen wasserlöslichen Polymeren.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Beschreibung

Bisher entwickelte Affinitäts-Sensoren für niedermolekulare Stoffe beruhen auf der Dissoziation eines immobilisierten und eines löslichen hochmolekularen Affinitätsliganden durch die konkurrierende Bindung des Analyten an einen der Bindungspartner (z. B. Shultz, J., Mansouri, S., Goldstein, I. J., Diabetes Care 5, 95, 1982) oder auf den physikochemischen Änderungen an einer Oberfläche mit immobilisierten Affinitätsliganden durch die Affinitätsbindung des Analyten (z. B. Bush, D. L., Rechnitz, G. A., Anal. Lett. 20, 1781, 1987). Es handelt sich also bei den bisher bekannten Sensorvarianten (vergl. Stein, K. und Neumann, K. D., Biosensoren, in G. Schwedt (Herausg.) Literaturdokumentation Biosensoren vom Vogel Verlag und Druck KG, Würzburg 1991) um Geräte, die eine Änderung von Affinitäts-Bindungsbeziehungen an der Fest-Flüssig-Grenzfläche in ein meßbares Signal umwandeln. Dies bedingt, daß die Einstellung des Gleichgewichtes verzögert, die Empfindlichkeit durch die Oberfläche begrenzt wird oder ganz besondere Auswahlkriterien für den Analyten und den Affinitäts-Bindungspartner gegeben sind und erfordert zudem die Immobilisierung eines Affinitätsliganden an einer Oberfläche.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, einen Affinitäts-Sensor bereitzustellen, der für viele mögliche Fälle von Affinitäts-Bindungsbeziehungen einsetzbar ist und nicht die Immobilisierung eines Affinitätsliganden an einer Oberfläche erfordert.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die sensorisch wirksame Komponente eine Hohlfaser oder eine Mikrokapsel mit einer eingeschlossenen kolloidalen Lösung von 2 makromolekularen Affinitätsliganden darstellt, die Affinitätsliganden wegen des Überschusses einer Komponente oder wegen der Monovalenz einer oder beider Komponenten nicht präzipitieren, einer der Affinitätsliganden aus seiner Bindung mit dem anderen durch einen niedermolekularen Analyten verdrängt werden kann, die Membran der Hohlfaser oder Mikrokapsel permeabel für den Analyten und unpermeabel für die beiden hochmolekularen Affinitätsliganden und die Viskosität der Lösung im Inneren der Hohlfaser durch eine physikalische Meßvorrichtung registrierbar ist. Die Meßanordnung ist für alle niedermolekularen Stoffe geeignet, für die polyklonale oder monoklonale Antikörper hergestellt werden können. Als zweiter hochmolekularer Bindungspartner ist generell ein Konjugat des Analyten mit einem natürlichen oder synthetischen Polymeren geeignet, außerdem kommen natürliche hochmolekulare Antigene mit einem dem Analyten strukturähnlichen Epitop in Frage. Besonders geeignet sind monoklonale Antikörper, die monovalent sind und nicht zur Präzipitation führen, weil so das hochmolekulare kolloiddisperse System im Inneren der Hohlfaser oder Kapsel in hoher Konzentration in stabiler Dispersion vorliegt. Es ist aber, wie im Beispiel dargelegt, auch möglich, eine Lösung aus polyvalenten (z. B. Concanavalin A) und bivalenten hochmolekularen Affinitätspartnern (z. B. Ficoll) im kolloidalen Zustand so einzustellen, daß die Dispersität stabil ist und selektiv von der Anwesenheit des niedermolekularen Analyten abhängt.

Ausführungsbeispiel

Eine Hohlfaser aus Celluloseacetat mit einem Innendurchmesser von 50 µm, Außendurchmesser 100 µm wird mit 2 Pipettenrohren verbunden (Abbildung, a) und

in ein Gefäß mit 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.3 eingebracht. Das System wird mit Puffer gefüllt, so daß der Meniscus in beiden Rohren auf gleicher Höhe liegt. Durch Anlegen von Unterdruck auf einer Seite des Rohres wird ein Höhenunterschied (Δh) erzeugt. Die Halbwertszeit τ_1 für den gravitationsbedingten Ausgleich des Höhenunterschiedes wird als Maß der Viskosität des Puffers gemessen. Danach wird das System mit einer Lösung aus Concanavalin A (1,7%) und Ficoll (1,7%) gefüllt und die Halbwertszeit τ_2 gemessen. Die spezifische Viskosität der Kolloide $\eta_{spz} = (\tau_2 - \tau_1)/\tau_1$ wird zunächst in Abwesenheit von Zucker im Probegefäß bestimmt, anschließend bei Anwesenheit von Glukose in unterschiedlicher Konzentration.

Die spez. Viskosität ist in starkem Maße von der Glukosekonzentration abhängig. Die Änderungen im mM-Bereich liegen um mehrere Größenordnungen über der Veränderung der spez. Viskosität durch die Erhöhung der Glukosekonzentration und besitzen das entgegengesetzte Vorzeichen (Abbildung, b). Abbildung: Schematischer Aufbau der Meßanordnung (a) und spezifische Viskosität der Innenlösung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration.

Patentansprüche

1. Affinitäts-Sensor, dadurch gekennzeichnet, daß die sensorisch wirksame Komponente eine Hohlfaser oder eine Mikrokapsel mit einer eingeschlossenen kolloidalen Lösung von 2 makromolekularen Affinitätsliganden darstellt, die Affinitätsliganden wegen des Überschusses einer Komponente oder wegen der Monovalenz einer oder beider Komponenten nicht präzipitieren, einer der Affinitätsliganden aus seiner Bindung mit dem anderen durch einen niedermolekularen Analyten verdrängt werden kann, die Membran der Hohlfaser oder Mikrokapsel permeabel für den Analyten und unpermeabel für die beiden hochmolekularen Affinitätsliganden und die Viskosität der Lösung im Inneren der Hohlfaser durch eine physikalische Meßvorrichtung registrierbar ist.
2. Affinitäts-Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer der hochmolekularen Affinitätsliganden ein Lektin, der andere ein Glykoligand und der Analyt ein Zucker ist.
3. Affinitäts-Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer der hochmolekularen Affinitätsliganden einen Antikörper gegen den Analyten darstellt, der andere ein Konjugat des Analyten mit einem natürlichen oder künstlichen wasserlöslichen Polymeren.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

